

INTERNATIONAL COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 30 April 1998 (30.04.98)	
International application No.: PCT/EP97/05783	Applicant's or agent's file reference: 4514/OA/WOKoe
International filing date: 20 October 1997 (20.10.97)	Priority date: 21 October 1996 (21.10.96)
Applicant: EMRICH, Thomas et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

21 February 1998 (21.02.98)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was



was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

ROCHE DIAGNOSTICS GMBH
Patentabteilung
D-68298 Mannheim
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 08 February 1999 (08.02.99)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 4514/OA/WOKoe	
International application No. PCT/EP97/05783	International filing date (day/month/year) 20 October 1997 (20.10.97)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☒ the common representative

Name and Address

BOEHRINGER MANNHEIM GMBH
D-68298 Mannheim
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

ROCHE DIAGNOSTICS GMBH
D-68298 Mannheim
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☒ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Beate Giffo-Schmitt

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
DOCUMENT TRANSMITTED

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

11 May 1999 (11.05.99)

International application No.

PCT/EP97/05783

International filing date (day/month/year)

20 October 1997 (20.10.97)

Applicant

ROCHE DIAGNOSTICS GMBH et al

The International Bureau transmits herewith the following documents and number thereof:

_____ copy of the English translation of the international preliminary examination report (Article 36(3)(a))

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Nestor Santesso

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

7

Applicant's or agent's file reference 4514/OA/WOKoe	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP97/05783	International filing date (day/month/year) 20 October 1997 (20.10.1997)	Priority date (day/month/year) 21 October 1996 (21.10.1996)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 16/10, C12P 21/08, G01N 33/577		
Applicant ROCHE DIAGNOSTICS GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.	
2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet.	
<input type="checkbox"/>	This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
These annexes consist of a total of _____ sheets.	
3. This report contains indications relating to the following items:	
I <input checked="" type="checkbox"/>	Basis of the report
II <input type="checkbox"/>	Priority
III <input type="checkbox"/>	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV <input type="checkbox"/>	Lack of unity of invention
V <input checked="" type="checkbox"/>	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
VI <input type="checkbox"/>	Certain documents cited
VII <input checked="" type="checkbox"/>	Certain defects in the international application
VIII <input checked="" type="checkbox"/>	Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 21 February 1998 (21.02.1998)	Date of completion of this report 28 December 1998 (28.12.1998)
Name and mailing address of the IPEA/EP European Patent Office D-80298 Munich, Germany Facsimile No. 49-89-2399-4465	Authorized officer Telephone No. 49-89-2399-0

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP97/05783

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1 - 20, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages _____, filed with the letter of _____,
pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. 1 - 9, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. _____, filed with the letter of _____,
Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/5-3/5, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 97/05783**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. Statement

Novelty (N)	Claims	3-8	YES
	Claims	1, 2, 9	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-9	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-9	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The following documents are referred to:

D1: Hinds et al., J. Med. Chem. Vol. 34, 1991, pages 1777-1789; and
D2: WO-A-92/09300.

1. In this respect, Table 1 shows that the known antibody 12CA5 also has an affinity in the claimed range (2.6×10^8 when the antigen Bio-N-HA is used).

Claim 1 is therefore not novel over this prior art (PCT Article 33(2)).

Since the antibody 12CA5 was used in the known manner for detecting haemagglutinin and fusion structures, the generally formulated use Claim 9 is also not novel (PCT Article 33(2)).

2. D1 and D2 describe other monoclonal peptide 9-antibodies. The monoclonal antibodies DB19/1 and DB19/25 have dissociation constants of 1.8×10^{-7} and 1.8×10^{-8} M respectively; this corresponds to an affinity of 0.56×10^6 and 0.56×10^7 M⁻¹ respectively

and, in the latter case, is only slightly below the claimed limit. Since the determination systems of D1 and the present invention are not the same (both with respect to the test methods and the peptide used, cf. page 1784, Table IV and the associated captions), it is possible that, in particular, the antibody DB19/25 may be covered by the scope of protection of Claims 1 and 2.

Moreover, D2 discloses the peptide 9-specific antibody DB19/10, even though it does not indicate any affinity data (cf. D2, example 8, and, in particular, page 124, lines 13-24).

3. Provision of monoclonal antibodies of the highest possible affinity is generally a desired aim. Consequently, no inventive step is involved in routine preparation of hybridomae and the screening thereof for clones which secrete high-affinity antibodies.

However, if preparation of antibodies with affinity or specificity characteristics requires more than just standard procedures, the particular antibodies produced are generally the result of random, uncontrolled recombination and mutation procedures.

Consequently, the claims which are not restricted to antibodies produced by a special filed hybridoma clone (Claims 1-4) do not appear to meet the requirements of PCT Article 33(3) or to contain all the technical features required (PCT Article 6).

4. Given the vague, functional definition of the antibodies as per Claims 1 and 2, and the lack of

comparable affinity parameters in relation to the prior art as described in D1 and D2, the antibodies as per Claims 3-5 are considered merely to be equivalent to the antibodies described in the prior art outlined in D1 and D2 and therefore non-inventive.

5. The process as per Claim 6 corresponds to the standard process for establishing and screening of hybridoma lines.

Claim 6 is therefore not inventive (PCT Article 33(3)).

There cannot be a causal correlation between the choice of fusion partner, immunogen or antigen used in screening and the achievement of particular and unexpected affinity properties.

Consequently, Claims 7 and 8 are also not considered inventive.

6. Claim 9 relates to the conventional use of an antibody as a structural partner in the immune test method. Novelty and inventive step of the present use claim are therefore also not established due to the lack of a new and inventive main claim (PCT Article 33(2) and (3)).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 97/05783

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Contrary to the requirements of PCT Rule 5.1(a)(ii) the description did not cite D1 and D2 and did not outline the relevant prior art disclosed therein.

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. Due to the functional definition of the antibodies, the scope of protection of Claims 1 and 2 is not clear (PCT Article 6). Moreover, it cannot be clearly delimited over the prior art (PCT Article 33(2); see Box V, points 1 and 2).

The description, Table 1, page 10 shows that the affinity constants determined differ significantly depending on the examination system and antibodies examined (Bio-C-HA or Bio-N-HA), that is, up to a factor 18 with antibodies R3A12.

Indicating the affinity constants without clearly defining the determination system therefore does not contain any clear and undisputed characterisation. Accordingly, the question arises as to how to compare the affinity information determined according to the description with the prior art.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

09/284787

PCT

An:	
BOEHRINGER MANNHEIM GMBH	
- Patentabteilung -	K BOEHRINGER MANNHEIM GMBH F
D-68298 Mannheim	Jg BEREICH PATENTE Wb
ALLEMAGNE	Si Eing 30. Dez. 1998 Kt
	Kl Eri. <i>[Signature]</i> Pp
P	Kb Ts Hi Sz Im Be S

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNGSBERICHTS
(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr)

28. 12. 98

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

4514/OA/WOK *[Signature]*

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP97/05783

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)
20/10/1997

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
21/10/1996

Anmelder

BOEHRINGER MANNHEIM GMBH et al.

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung
beauftragten Behörde



Europäisches Patentamt
D-80298 München
Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d
Fax: (+49-89) 2399-4465

Bevollmächtigter Bediensteter

[Signature]
Hebert, W

Tel. (+49-89) 2399-8161



09/284787

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'L 30 DEC 1998

WIPO

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 4514/OA/WOK	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP97/05783	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 20/10/1997	Priority date (Tag/Monat/Jahr) 21/10/1996
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C07K16/10		
Anmelder BOEHRINGER MANNHEIM GMBH et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - ☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 21/02/1998	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 28. 12. 98
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Bevollmächtigter Bediensteter Hoesel, H Telefon (+49-89) 2399-8693 

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP97/05783

I. Grundlag des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-20 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1.9 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/5-3/5 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	3 - 8
	Nein: Ansprüche	1, 2, 9
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1 - 9
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1 - 9
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: Hinds et al, J.Med.Chem. vol. 34, 1991, p. 1777-1789

D2: WO-A-92/09300

SEKTION VIII:

1. Aufgrund der funktionellen Definition der Antikörper ist der Schutzzumfang der Ansprüche 1 und 2 nicht klar (Art. 6 PCT) und zudem nicht eindeutig vom Stand der Technik abgrenzbar (Art. 33(2) PCT, siehe Punkt 2 und 3).

Aus der Beschreibung, Tabelle 1, S. 10, ist zu entnehmen, daß die ermittelten Affinitätskonstanten je nach Untersuchungssystem und untersuchtem Antikörper (Bio-C-HA oder Bio-N-HA) signifikant unterschiedlich, d.h. bis zu einem Faktor 18 bei Antikörper R3A12 ausfallen.

Eine Angabe der Affinitätskonstante ohne klare Definition des Ermittlungssystems beinhaltet somit keine eindeutige und unstrittige Charakterisierung. Demgemäß stellt sich die Frage nach der Vergleichbarkeit der gemäß der Beschreibung ermittelten Affinitätsangaben, mit denen des Stands der Technik.

SEKTION V:

2. Zudem ist aus Tabelle 1 zu entnehmen, daß auch der bekannte Antikörper 12CA5 eine Affinität im anspruchsgemäßen Bereich aufweist ($2,6 \times 10^8$ bei Verwendung des Antigens Bio-N-HA).

Anspruch 1 ist somit nicht neu hinsichtlich dieses Stands der Technik (Art. 33(2) PCT).

Da der Antikörper 12CA5 bekanntlich zum Nachweis des Hämagglutinins wie auch zum Nachweis von Fusionskonstrukten verwendet wurde, ist auch der allgemein formulierte Verwendungsanspruch 9 nicht neu im Sinne von Art. 33(2) PCT.

3. Weitere monoklonale Peptid 9-Antikörper sind in D1 und D2 beschrieben. Die monoklonalen Antikörper DB19/1 und DB19/25 weisen Dissoziationskonstanten von $1,8 \times 10^{-7}$ bzw. $1,8 \times 10^{-8}$ M, was einer Affinität von $0,56 \times 10^6$ bzw. $0,56 \times 10^7$ M⁻¹ entspricht und im letzteren Fall nur unwesentlich unterhalb des anspruchsgemäßen Limits liegt. Da die Bestimmungssysteme von D1 und der vorliegenden Anmeldung nicht übereinstimmen (sowohl hinsichtlich der Testmethode wie auch des eingesetzten Peptids, vgl. S. 1784, Table IV sowie die dazugehörige Legende), ist nicht auszuschließen, daß insbesondere der Antikörper DB19/25 in den Schutzbereich von der Ansprüche 1 und 2 fällt.

Weiterhin ist aus D2 der Peptid 9-spezifische Antikörper DB19/10, wenn auch ohne Affinitätsangabe, offenbart (D2, Example 8, und insbesondere S. 124, Z. 13 - 24).

4. Die Bereitstellung von monoklonalen Antikörpern möglichst hoher Affinität ist allgemein ein erwünschtes Ziel. In der routinemäßigen Herstellung von Hybridomen und deren Screening nach Klonen, die hochaffine Antikörper sekretieren, ist somit nichts erfinderisches zu sehen.

Sollte jedoch die Bereitstellung von Antikörpern mit Affinitäts- oder Spezifitätscharakteristika mehr als nur die Ausübung von Standardprozeduren erfordern, sind die so erhaltenen, besonderen Antikörper, im allgemeinen das Resultat von zufallsbedingten, ungesteuerten Rekombinations- und Mutationsvorgängen.

Daher scheinen Ansprüche, die nicht auf Antikörper, die von einem speziellen, hinterlegten Hybridomaklon produziert werden, eingeschränkt sind (Ansprüche 1 - 4), einerseits nicht die Erfordernisse der Art. 33(3) PCT zu erfüllen oder andererseits nicht alle notwendigen technischen Merkmale zu beinhalten (Art. 6 PCT).

5. Angesichts der unklaren, funktionellen Definition der Antikörper gemäß Anspruch 1 und 2, und des Fehlens vergleichbarer Affinitätsparameter gegenüber dem Stand der Technik gemäß D1 und D2, werden die Antikörper gemäß der Ansprüche 3 - 5 lediglich als Äquivalente zu den im Stand der Technik gemäß D1 und D2 vorbeschriebenen Antikörpern und somit als nicht erfinderisch

angesehen.

6. Das Verfahren gemäß Anspruch 6 entspricht dem Standardverfahren zur Etablierung und zum Screening von Hybridomalinen.

Anspruch 6 ist somit nicht erfinderisch (Art.33(3) PCT).

Weder die Auswahl des Fusionspartners, noch des Immunogens oder des im Screening eingesetzten Antigens ist ursächlich mit der Erzielung besonderer und unerwarteter Affinitätseigenschaften korrelierbar.

Daher werden auch die Ansprüche 7 und 8 nicht als erfinderisch angesehen.

7. Anspruch 9 bezieht sich auf die konventionelle Verwendung eines Antikörpers als Bindungspartner in Immuntestverfahren. Neuheit und erfinderische Tätigkeit des vorliegenden Verwendungsanspruchs sind somit aufgrund des Fehlens eines neuen und erfinderischen Hauptanspruchs ebenfalls nicht gegeben (Art. 33(2) und (3) PCT).

SEKTION VII:

8. In Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT sind in der Beschreibung weder der in den Dokumenten D1 und D2 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch diese Dokumente angegeben.

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 4514/OA/WOKoe	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 97/05783	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 20/10/1997	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 21/10/1996
Anmelder BOEHRINGER MANNHEIM GMBH et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 5 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. ☒ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).
2. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).
3. ☒ In der internationalen Anmeldung ist ein Protokoll einer Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz offenbart; die internationale Recherche wurde auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt,

☐ das zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht wurde.
☒ das vom Anmelder getrennt von der internationalen Anmeldung vorgelegt wurde,

☐ dem jedoch keine Erklärung beigelegt war, daß der Inhalt des Protokolls nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der eingereichten Fassung hinausgeht.

☐ das von der Internationalen Recherchenbehörde in die ordnungsgemäße Form übertragen wurde.
4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt.
5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der Feld III angegebenen Fassung von dieser Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Internationalen Recherchenbehörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.
6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen:

Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen
☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

F Id I Bemerkung n zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

F Id II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Bemerkung : Obwohl der Anspruch 9 (teilweise, in so weit es sich handelt um ein in vivo Verfahren) sich auf ein Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird, bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07K16/10 C12P21/08 G01N33/577

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	M. HINDS ET AL.: "Synthesis, conformational properties, and antibody recognition of peptides containing beta-turn mimetics based on alpha-alkylproline derivatives." JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, Bd. 34, Nr. 6, Juni 1991, WASHINGTON, DC, USA, Seiten 1777-1789, XP002057282 siehe Seite 1783, rechte Spalte, Zeile 29 - Seite 1784, rechte Spalte, Zeile 61 siehe Tabelle IV --- -/--	1,6,9



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

27. Februar 1998

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

19.03.98

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Nooij, F

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	P. KOLODZIEJ ET AL.: "Epitope tagging and protein surveillance." METHODS IN ENZYMOLOGY, Bd. 194, 1991, NEW YORK, NY, USA, Seiten 508-519, XP002057283 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 510, Zeile 25 - Seite 511, Zeile 6 ---	1-9
A	J. FIELD ET AL.: "Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from Saccharomyces cerevisiae by use of an epitope addition method." MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Bd. 8, Nr. 5, Mai 1988, WASHINGTON, DC, USA, Seiten 2159-2165, XP002057284 in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 2160, linke Spalte, Zeile 31 - Zeile 44 ---	1-9
A	Y. CHEN ET AL.: "Expression and localization of two low molecular weight GTP-binding proteins, Rab8 and Rab10, by epitope tag." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, Bd. 90, Nr. 14, 15.Juli 1993, WASHINGTON, DC, USA, Seiten 6508-6512, XP002057285 in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung siehe Abbildung 1 ---	1-9
A	WO 92 09300 A (ITEREC PHARMACEUTICALS LTD, PARTNERSHIP) 11.Juni 1992 siehe Beispiel 8 -----	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/05783

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9209300 A	11-06-92	AU 668347 B	02-05-96
		CA 2090860 A	22-05-92
		EP 0558671 A	08-09-93
		JP 6507378 T	25-08-94
		US 5504190 A	02-04-96
		US 5556762 A	17-09-96

09/284787

PCT

(Regel 44.1 PCT)

T. 19.05.94 (CN. 62)

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220

Diese Anmerkungen sollen grundlegende Hinweise zur Einreichung von Änderungen gemäß Artikel 19 geben. Diesen Anmerkungen liegen die Erfordernisse des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens (PCT), der Ausführungsordnung und der Verwaltungsrichtlinien zu diesem Vertrag zugrunde. Bei Abweichungen zwischen diesen Anmerkungen und obengenannten Texten sind letztere maßgebend. Nähere Einzelheiten sind dem PCT-Leitfaden für Anmelder, einer Veröffentlichung der WIPO, zu entnehmen.

Die in diesen Anmerkungen verwendeten Begriffe "Artikel", "Regel" und "Abschnitt" beziehen sich jeweils auf die Bestimmungen des PCT-Vertrags, der PCT-Ausführungsordnung bzw. der PCT-Verwaltungsrichtlinien.

HINWEISE ZU ÄNDERUNGEN GEMÄSS ARTIKEL 19

Nach Erhalt des internationalen Recherchenberichts hat der Anmelder die Möglichkeit, einmal die Ansprüche der internationalen Anmeldung zu ändern. Es ist jedoch zu betonen, daß, da alle Teile der internationalen Anmeldung (Ansprüche, Beschreibung und Zeichnungen) während des internationalen vorläufigen Prüfungsverfahrens geändert werden können, normalerweise keine Notwendigkeit besteht, Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 einzureichen, außer wenn der Anmelder z.B. zum Zwecke eines vorläufigen Schutzes die Veröffentlichung dieser Ansprüche wünscht oder ein anderer Grund für eine Änderung der Ansprüche vor ihrer internationalen Veröffentlichung vorliegt. Weiterhin ist zu beachten, daß ein vorläufiger Schutz nur in einigen Staaten erhältlich ist.

Welche Teile der internationalen Anmeldung können geändert werden?

Im Rahmen von Artikel 19 können nur die Ansprüche geändert werden.

In der internationalen Phase können die Ansprüche auch nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert (oder nochmals geändert) werden. Die Beschreibung und die Zeichnungen können nur nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert werden.

Beim Eintritt in die nationale Phase können alle Teile der internationalen Anmeldung nach Artikel 28 oder gegebenenfalls Artikel 41 geändert werden.

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Innerhalb von zwei Monaten ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts oder innerhalb von sechzehn Monaten ab dem Prioritätsdatum, je nachdem, welche Frist später abläuft. Die Änderungen gelten jedoch als rechtzeitig eingereicht, wenn sie dem Internationalen Büro nach Ablauf der maßgebenden Frist, aber noch vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung (Regel 46.1) zugehen.

Wo sind die Änderungen nicht einzureichen?

Die Änderungen können nur beim Internationalen Büro, nicht aber beim Anmeldeamt oder der Internationalen Recherchenbehörde eingereicht werden (Regel 46.2).

Falls ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung eingereicht wurde/wird, siehe unten.

In welcher Form können Änderungen erfolgen?

Eine Änderung kann erfolgen durch Streichung eines oder mehrerer ganzer Ansprüche, durch Hinzufügung eines oder mehrerer neuer Ansprüche oder durch Änderung des Wortlauts eines oder mehrerer Ansprüche in der eingereichten Fassung.

Für jedes Anspruchsblatt, das sich aufgrund einer oder mehrerer Änderungen von dem ursprünglich eingereichten Blatt unterscheidet, ist ein Ersatzblatt einzureichen.

Alle Ansprüche, die auf einem Ersatzblatt erscheinen, sind mit arabischen Ziffern zu numerieren. Wird ein Anspruch gestrichen, so brauchen, die anderen Ansprüche nicht neu numeriert zu werden. Im Fall einer Neunummerierung sind die Ansprüche fortlaufend zu numerieren (Verwaltungsrichtlinien, Abschnitt 205 b)).

Die Änderungen sind in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Welche Unterlagen sind den Änderungen beizufügen?

Begleitschreiben (Abschnitt 205 b)):

Die Änderungen sind mit einem Begleitschreiben einzureichen.

Das Begleitschreiben wird nicht zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht. Es ist nicht zu verwechseln mit der "Erklärung nach Artikel 19(1)" (siehe unten, "Erklärung nach Artikel 19 (1)").

Das Begleitschreiben ist nach Wahl des Anmelders in englischer oder französischer Sprache abzufassen. Bei englischsprachigen internationalen Anmeldungen ist das Begleitschreiben aber ebenfalls in englischer, bei französischsprachigen internationalen Anmeldungen in französischer Sprache abzufassen.

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220 (Fortsetzung)

Im Begleitschreiben sind die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen anzugeben. So ist insbesondere zu jedem Anspruch in der internationalen Anmeldung anzugeben (gleichlautende Angaben zu verschiedenen Ansprüchen können zusammengefaßt werden), ob

- i) der Anspruch unverändert ist;
- ii) der Anspruch gestrichen worden ist;
- iii) der Anspruch neu ist;
- iv) der Anspruch einen oder mehrere Ansprüche in der eingereichten Fassung ersetzt;
- v) der Anspruch auf die Teilung eines Anspruchs in der eingereichten Fassung zurückzuführen ist.

Im folgenden sind Beispiele angegeben, wie Änderungen im Begleitschreiben zu erläutern sind:

1. [Wenn anstelle von ursprünglich 48 Ansprüchen nach der Änderung einiger Ansprüche 51 Ansprüche existieren]:
"Die Ansprüche 1 bis 29, 31, 32, 34, 35, 37 bis 48 werden durch geänderte Ansprüche gleicher Numerierung ersetzt; Ansprüche 30, 33 und 36 unverändert; neue Ansprüche 49 bis 51 hinzugefügt."
2. [Wenn anstelle von ursprünglich 15 Ansprüchen nach der Änderung aller Ansprüche 11 Ansprüche existieren]:
"Geänderte Ansprüche 1 bis 11 treten an die Stelle der Ansprüche 1 bis 15."
3. [Wenn ursprünglich 14 Ansprüche existierten und die Änderungen darin bestehen, daß einige Ansprüche gestrichen werden und neue Ansprüche hinzugefügt werden]:
Ansprüche 1 bis 6 und 14 unverändert; Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt. "Oder" Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt; alle übrigen Ansprüche unverändert."
4. [Wenn verschiedene Arten von Änderungen durchgeführt werden]:
"Ansprüche 1-10 unverändert; Ansprüche 11 bis 13, 18 und 19 gestrichen; Ansprüche 14, 15 und 16 durch geänderten Anspruch 14 ersetzt; Anspruch 17 in geänderte Ansprüche 15, 16 und 17 unterteilt; neue Ansprüche 20 und 21 hinzugefügt."

"Erklärung nach Artikel 19(1)" (Regel 46.4)

Den Änderungen kann eine Erklärung beigefügt werden, mit der die Änderungen erläutert und ihre Auswirkungen auf die Beschreibung und die Zeichnungen dargelegt werden (die nicht nach Artikel 19 (1) geändert werden können).

Die Erklärung wird zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht.

Sie ist in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Sie muß kurz gehalten sein und darf, wenn in englischer Sprache abgefaßt oder ins Englische übersetzt, nicht mehr als 500 Wörter umfassen

Die Erklärung ist nicht zu verwechseln mit dem Begleitschreiben, das auf die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen hinweist, und ersetzt letzteres nicht. Sie ist auf einem gesonderten Blatt einzureichen und in der Überschrift als solche zu kennzeichnen, vorzugsweise mit den Worten "Erklärung nach Artikel 19 (1)".

Die Erklärung darf keine herabsetzenden Äußerungen über den internationalen Recherchenbericht oder die Bedeutung von in dem Bericht angeführten Veröffentlichungen enthalten. Sie darf auf im internationalen Recherchenbericht angeführte Veröffentlichungen, die sich auf einen bestimmten Anspruch beziehen, nur im Zusammenhang mit einer Änderung dieses Anspruchs Bezug nehmen.

Auswirkungen eines bereits gestellten Antrags auf internationale vorläufige Prüfung

Ist zum Zeitpunkt der Einreichung von Änderungen nach Artikel 19 bereits ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung gestellt worden, so sollte der Anmelder in seinem Interesse gleichzeitig mit der Einreichung der Änderungen beim Internationalen Büro auch eine Kopie der Änderungen bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde einreichen (siehe Regel 62.2 a), erster Satz).

Auswirkungen von Änderungen hinsichtlich der Übersetzung der internationalen Anmeldung beim Eintritt in die nationale Phase

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß bei Eintritt in die nationale Phase möglicherweise anstatt oder zusätzlich zu der Übersetzung der Ansprüche in der eingereichten Fassung eine Übersetzung der nach Artikel 19 geänderten Ansprüche an die bestimmten/ausgewählten Ämter zu übermitteln ist.

Nähere Einzelheiten über die Erfordernisse jedes bestimmten/ausgewählten Amtes sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 4514/OA/WOKoe	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 97/05783	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 20/10/1997	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 21/10/1996
Anmelder BOEHRINGER MANNHEIM GMBH et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 5 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. ☒ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).
2. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).
3. ☒ In der internationalen Anmeldung ist ein Protokoll einer Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz offenbart; die internationale Recherche wurde auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt,
 - ☐ das zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht wurde.
 - ☒ das vom Anmelder getrennt von der internationalen Anmeldung vorgelegt wurde,
 - ☐ dem jedoch keine Erklärung beigelegt war, daß der Inhalt des Protokolls nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der eingereichten Fassung hinausgeht.
 - ☐ das von der Internationalen Recherchenbehörde in die ordnungsgemäße Form übertragen wurde.
4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung
 - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
 - ☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt.
5. Hinsichtlich der Zusammenfassung
 - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
 - ☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der Feld III angegebenen Fassung von dieser Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Internationalen Recherchenbehörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.
6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen:

Abb. Nr. _____ ☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht rech rchi rbar erwiesen haben (Fortsetzung v n Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Bemerkung : Obwohl der Anspruch 9 (teilweise, in so weit es sich handelt um ein in vivo Verfahren) sich auf ein Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird, bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/05783

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9209300 A	11-06-92	AU 668347 B	02-05-96
		CA 2090860 A	22-05-92
		EP 0558671 A	08-09-93
		JP 6507378 T	25-08-94
		US 5504190 A	02-04-96
		US 5556762 A	17-09-96



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 16/10, C12P 21/08, G01N 33/577</p>	A1	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/17691</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 30. April 1998 (30.04.98)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/05783</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 20. Oktober 1997 (20.10.97)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 196 43 314.2 21. Oktober 1996 (21.10.96) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; D-68298 Mannheim (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EMRICH, Thomas [DE/DE]; Blombergstrasse 9, D-82393 Iffeldorf (DE). HINZPETER, Matthias [DE/DE]; Windeckstrasse 41, D-81375 München (DE). GROL, Michael [DE/DE]; Possenhofener Strasse 22, D-82340 Feldafing (DE).</p> <p>(74) Gemeinsamer Vertreter: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH; Patentabteilung, D-68298 Mannheim (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, IL, JP, KR, NO, NZ, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	
<p>(54) Title: MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST THE YPYDVPDYA EPITOPE, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME AND THEIR USE</p>		
<p>(54) Bezeichnung: MONOKLONALE ANTIKÖRPER GEGEN DAS EPITOP YPYDVPDYA, VERFAHREN ZU DEREN HERSTELLUNG UND IHRE VERWENDUNG</p>		
<p>(57) Abstract</p> <p>Monoclonal antibodies against the YPYDVPDYA epitope derived from the haemagglutinin of the human influenza virus are useful for detecting and isolating native haemagglutinin of the human influenza virus, modified haemagglutinin or haemagglutinin fusion proteins and have an affinity > 10⁸ M⁻¹, in particular from 10⁹ to 10¹⁰ M⁻¹.</p>		
<p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft monoklonale Antikörper gegen das Epitop YPYDVPDYA, das aus dem Hämagglutinin des humanen Influenzavirus abgeleitet ist und die zum Nachweis und zur Isolierung von nativem Hämagglutinin des humanen Influenzavirus, von modifiziertem Hämagglutinin oder von Hämagglutinin-Fusionsproteinen geeignet sind sowie eine Affinität > 10⁸M⁻¹, insbesondere von 10⁹ bis 10¹⁰M⁻¹ aufweisen.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

5 **Monoklonale Antikörper gegen das Epitop YPYDVPDYA, Verfahren zu deren
Herstellung und ihre Verwendung**

Die Erfindung betrifft monoklonale Antikörper gegen das Epitop YPYDVPDYA, das aus dem Hämagglutinin des humanen Influenzavirus abgeleitet ist und die zum Nachweis und zur Isolierung von nativem Hämagglutinin des humanen Influenzavirus, von modifiziertem Hämagglutinin oder von Hämagglutinin-Fusionsproteinen geeignet sind sowie
10 eine Affinität $> 10^8 \text{ M}^{-1}$, insbesondere von 10^9 bis 10^{10} M^{-1} aufweisen.

Hämagglutinine sind Substanzen - meist Glykoproteine - mit der Fähigkeit, Erythrocyten zu agglutinieren. Sie kommen u.a. als Bestandteile von Viren, wie z.B. in Myxoviren
15 oder Pockenviren vor. Von besonderer Bedeutung ist das Hämagglutinin (HA) des Influenzavirus, einem membranumhüllten Virus mit einem (-) RNA-Genom. Das Influenza-Hämagglutinin ist ein transmembranales Oberflächenantigen, das in Form von Spikes aus der sphärischen Lipidhülle herausragt, wie man auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen erkennen kann. Die HA-Spikes sind Trimere, deren Monomere aus
20 zwei Polypeptidketten bestehen, HA1(46.000-65.000 D) und HA2(21.000-30.000 D). Das Hämagglutinin in der Membran des Influenzavirus ermöglicht es dem Virus, in empfängliche Wirtszellen, z.B. des Respirationstraktes, einzudringen.

Bekanntermaßen sind Antikörper gegen Hämagglutinin effektive Hemmer der Virusinfektion. Die spezifische Affinität des Antikörpers gilt im allgemeinen jedoch nicht für das
25 gesamte makromolekulare Protein, sondern nur für ein spezielles Epitop.

Um Proteine zu analysieren, ist heute die Technik des Epitop-Taggings, d.h. das Anfügen eines Epitops an ein Protein durch molekularbiologische Techniken, eine häufig angewandte Methode und prinzipiell unabhängig vom verwendeten Epitop. Dabei wird die
30 Primärsequenz eines beliebigen Proteins mit Hilfe rekombinanter Techniken um einige

wenige Aminosäuren erweitert. Ausschlaggebend ist lediglich das Vorhandensein eines spezifischen und hochaffinen Antikörpers mit bekannter Erkennungssequenz. Mit Hilfe von Antikörpern, die spezifisch gegen den erweiterten Proteinanteil gerichtet sind, bietet diese Methode die Möglichkeit, z.B. das Molekulargewicht eines Proteins, seine zelluläre
5 Lokalisation, posttranslationale Modifizierungen oder Wechselwirkungen mit anderen Faktoren zu analysieren, ohne daß Protein-spezifische Antikörper vorhanden sein müssen.

Virale Epitope haben dabei gegenüber zellulären Epitopen den Vorteil, daß diese Proteinsequenzen in bakteriellen und eukaryontischen Proteinen in der Regel nicht vor-
10 kommen und damit keine Kreuzreaktionen in bakteriellen oder zellulären Systemen zu erwarten sind.

Ein häufig in der Literatur beschriebenes virales Epitop, das für derartige Analysen verwendet wird, ist aus dem Hämagglutinin des humanen Influenzavirus abgeleitet. Dieses Epitop weist die Aminosäuresequenz YPYDVPDYA (98-106) auf (Field, J. et al (1988), Mol. Cell. Biol. Vol. 8, Nr. 5, 2159-2165 und Wilson et al., Cell 37, 767 - 778, 1984). Monoklonale Antikörper (mAK) gegen dieses Epitop sind beschrieben und verfügbar, so z.B. der mAK 12CA5 (P.A. Kolodziej und Young, R.A., Meth. Enzymol. (1991), Vol.
20 194, 508-519; Chen, Y.-T. et al (1993), Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 90, 6508-6512)) und der Anti-HA-BabCo.

Diese Antikörper besitzen jedoch den Nachteil, daß ihre Affinität nicht genügend hoch ist, was dazu führt, daß für eine sensitive Detektion entsprechender Fusionsproteine der
25 Epitop-spezifische Antikörper in einer hohen Konzentration eingesetzt werden muß, wodurch unspezifische Wechselwirkungen hervorgerufen werden können, die z.B. als Kreuzreaktionen im Western-Blot deutlich werden (vgl. Chen et al., S. 6510).

Bedingt durch die unzureichende Affinität ist auch eine geringere Sensitivität der bekannten Anti-HA-mAK zu verzeichnen.
30

Der Erfindung lag deshalb die Aufgabe zugrunde, monoklonale Antikörper gegen das virale Epitop YPYDVPDYA bereitzustellen, die eine höhere Affinität aufweisen und die somit zu hochsensitiven Hämagglutinin-Nachweisen oder HA-Fusionsprotein-Nachweisen geeignet sind und reproduzierbare Ergebnisse liefern.

5

Erfindungsgemäß wurden monoklonale Antikörper bereitgestellt, die das Epitop mit der Aminosäuresequenz YPYDVPDYA (98-106) des Hämagglutinis des humanen Influenzavirus sowie entsprechende Fragmente hiervon erkennen und eine Affinität $> 10^8 \text{ M}^{-1}$, insbesondere von $10^9 - 10^{10} \text{ M}^{-1}$ aufweisen. Unter Epitopfragmenten werden dabei insbesondere solche Aminosäuresequenzen verstanden, die mindestens 70% der Sequenz YPYDVPDYA entsprechen bzw. mindestens um ein bis zwei terminale Aminosäuren verkürzt sind.

10

Zur Herstellung der monoklonalen Antikörper wurden Kleinsäuger, vorzugsweise Ratten, wie z.B. Lou/C-Ratten oder Mäuse, wie z.B. BalbC-Mäuse, oder Kaninchen, mit einem nach Standardmethoden synthetisierten HA-Peptid immunisiert. Es wird als Antigen ein ungekoppeltes HA-Peptid oder ein HA-Peptid, das gegebenenfalls über ein Carrier-Protein N- oder C-terminal gekoppelt ist oder ein HA-Fusionsprotein eingesetzt. Vorzugsweise wurden als Carrier-Proteine Keyhole Limpet Hämocyanin (KLH) oder Bovines Serumalbumin (BSA) verwendet. Anschließend wurden B-Lymphozyten aus der Milz der Tiere isoliert und durch Zellfusion mit geeigneten Myelomzellen oder nach anderen an sich bekannten Verfahren, wie z.B. mittels Onkogene (Jonak, Z.L. et al, (1988) Adv. Drug Rev. 2:207-228) oder in einem elektrischen Feld (Zimmermann, U. (1982) Biochim. Biophys. Acta 694:227-277) immortalisiert. Erfindungsgemäß bevorzugt wurde die Zellfusion mit Milzzellen von Lou/C-Ratten und Myelomzellen der Linie Maus P3x63-Ag8,653 (Kearney, J.F. et al (1979), J. Immunol. 123, 1548-1550) durchgeführt.

20

25

Dabei werden die Lymphozyten und die Myelomzellen nach den bekannten Verfahren, insbesondere Polyethylenglykolfusion (PEG), Virus-Fusion oder Elektrofusion fusioniert

30

und entstehende Hybridzellen (Zellklone) nach ebenfalls bekannten Verfahren, wie z.B. durch Einsatz von Selektionsmedien, selektiert.

5 So wurden beispielsweise positive Klone zunächst mit HA-Peptiden und dann mit HA-Fusionsproteinen getestet. In einem ersten Screen wurde ein biotinyliertes HA-Peptid, z.B. Bio-C-HA (Acetyl-YPYDVPDYAGSGSK(ϵ -Bionoyl)-Amid) oder Bio-N-HA (Biotinoyl- ϵ -Aca-SGSGYPYDVPDYA-Amid), und in einem zweiten Screen eine HA-getaggte Glutathion-S-Transferase (GST) verwendet. Wiederum positive Klone wurden anschließend mit Hilfe der Plasmonresonanz in einem BiaCore-System auf ihre Affinität
10 untersucht und selektioniert.

Die Hybridzellen wurden nach bekannten Verfahren kloniert, kultiviert und vermehrt und gegebenenfalls in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

15 Als aktivste Zellklone mit stabiler Antikörperproduktion wurden die Zelllinien R 3F10, R 3A12 und R 6D12 etabliert. Das Hybridom R 3A12 wurde in der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig unter der Nummer DSM ACC2286 am 08.10.1996 hinterlegt.

20 Zur Antikörpergewinnung wurden die Hybridzellen in der Zellkultur oder gegebenenfalls in vivo durch Transplantation als Ascitestumore weitervermehrt. Die mAK wurden aus den Zellkulturüberständen oder gegebenenfalls aus der Ascitesflüssigkeit der tumor-tragenden Versuchstiere isoliert.

25 Erfindungsgemäß werden die von den Hybridzellen in hoher Konzentration produzierten mAK, die sich durch ausgezeichnete Spezifität und Bindungsstärke für das Epitop YPYDVPDYA des Hämagglutinins des humanen Influenzavirus bzw. für entsprechende Epitop-Fragmente auszeichnen, erhalten. Sie ermöglichen den hochsensitiven Nachweis und die Isolierung von Hämagglutinin sowie von Proteinen, an die das HA-Epitop
30 YPYDVPDYA angefügt wurde.

Die Affinität der erfindungsgemäßen mAK liegt bei $> 10^8 \text{ M}^{-1}$. So erwies sich die Affinität des mAK 3F10 mit 10^{10} M^{-1} ungefähr um das 30-fache höher als die der bekannten Antikörper 12CA5 (10^8 M^{-1}) und BabCo (10^7 M^{-1}).

Die Affinität der erfindungsgemäßen mAK 3A12 und 6D12 beträgt 10^9 M^{-1} und liegt
5 damit ebenfalls über der der bekannten Antikörper. Die erfindungsgemäßen mAK sind in wesentlich geringeren Konzentrationen einsetzbar und Kreuzreaktionen sind nahezu auszuschließen. Sie ermöglichen eine verbesserte Sensitivität der Detektion. Es zeigte sich, daß sie sowohl natives HA des Influenzavirus, modifiziertes HA als auch HA-Fusionsproteine erkennen. Sie sind somit in an sich bekannten Nachweisreaktionen, wie z.B.
10 dem Festphasen-Zwei-Seiten-Bindungstest zur Bestimmung von Proteinen sehr gut einsetzbar.

Legenden zu den Abbildungen

15 Abbildung 1:

Affinitäten der erfindungsgemäßen mAK im Vergleich zu den mAK 12CA5 und Anti-HA BabCo.

Abbildung 2:

20 Immunoblot-Analyse eines HA-modifizierten Glutathion-S-transferase-Proteins mit erfindungsgemäßen mAK (Klon 3F10) und anti-HA nach dem Stand der Technik (Klon 12CA5); a) Detektion mit anti-Ratte-Peroxidase, b) anti-Ratte-Biotin/Streptavidin-Peroxidase.

25 Abbildung 3:

Immunoblot-Analyse eines HA-modifizierten Glutathion-S-transferase-Proteins mit erfindungsgemäßen mAK (Klon 3F10) und anti-HA nach dem Stand der Technik (Klon 12CA5).

Abbildung 4:

Immunoblot-Analyse eines HA-modifizierten Glutathion-S-transferase-Proteins mit Enzym (Peroxidase-) Konjugaten eines erfindungsgemäßen Antikörpers (Klon 3F10) und eines Antikörpers entsprechend dem Stand der Technik (Klon 12CA5).

5

Abbildung 5:

Immunpräzipitation eines HA-modifizierten Green-Fluorescent (GFP-HA)-Proteins mit erfindungsgemäßigem mAK (Klon 3F10) und anti-HA nach dem Stand der Technik (Klon 12CA5).

10

Anschließend wird die Erfindung an folgenden Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Beispiel 1:

15

Herstellung der Klone R 3F10, R 3A12 und R 6D12HA-Peptid-Herstellung

20 Folgende Peptide wurden synthetisiert:

Bio-C-HA (Acetyl-YPYDVPDYAGSGSK(ϵ -Biotinoyl)-Amid)

Bio-N-HA (Biotinoyl- ϵ -Aca-SGSGYPYDVPDYA-Amid)

KLH-MPS-CUZU-HA-C

KLH-MPS-CUSU-HA-N

25

Immunisierung von Kleinsäugern

Lou/C-Ratten wurden intraperitoneal mit KLH-gekoppeltem HA-Peptid nach folgendem Schema immunisiert:

30

Zu einer Grundimmunisierung der Tiere wurden 50 µg KLH-gekoppeltes HA-Peptid in komplettem Freund'schen Adjuvans injiziert.

Weitere Immunisierungen wurden mit 50 µg KLH-gekoppeltem HA-Peptid in inkomplettem Freund'schen Adjuvans durchgeführt.

Fusion

Die sich anschließende Fusion der Milzzellen von den Lou/C-Ratten erfolgte mit Maus P3x63-Ag8,653 in Gegenwart von PEG nach Kremmer et al (1990) Hybridoma 9, 309-317.

Durchführung der Selektion der Klone

15 Screening-Schema:

1. Screen

- Eine SA-beschichtete Mikrotiterplatte (MTP) wurde mit 1 µg/ml Bio-C-HA bzw. Bio-N-HA beschichtet,
- 20 - Hybridomaüberstände wurden unverdünnt verwendet und in die beschichtete MTP gegeben,
- die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte mit Hilfe von Anti-Ratte-POD-Konjugat/TMB-Substrat.

25 2. Screen

- Eine Maxisorb-MTP wurde mit HA-getaggtter GST (1 µl/ml in Carbonat-Puffer) beschichtet,
- die beim 1. Screen ausgewählten Hybridomaüberstände wurden wiederum unverdünnt verwendet und in die beschichtete MTP gegeben,
- 30 - die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte mit Hilfe von Anti-Ratte-POD-Konjugat/TMB-Substrat.

3./4. Screen

- Es wurden BiaCore-Messungen mit analoger Beschichtung durchgeführt.

5 Ergebnis

Mit Hilfe der Plasmonresonanz in dem BiaCore-System wurden 5 Klone mit der höchsten Affinität und der längsten Halbwertszeit der Dissoziation selektioniert. Sie wurden mit R 3F10, R 3A12, R 6D12, R 4H10 und M5B9 bezeichnet. Die Affinität war nur geringfügig unterschiedlich in Abhängigkeit der biotinoylierten Position der Peptide (C- oder N-Terminus - vgl. Abb. 1).

Die Klone R 3F10, R 3A12 und R 6D12 wurden als Zelllinien etabliert. Sie zeigen ein gutes Wachstum und eine stabile Antikörperproduktion, wobei die produzierten Antikörper eine um den Faktor 10 bis 100 höhere Affinität als die monoklonalen Antikörper des Standes der Technik 12CA5 und Anti-HA BabCo aufweisen.

Abb. 1 zeigt die Affinitäten der erfindungsgemäßen mAK im Vergleich zu den mAK 12CA5 und Anti-HA BabCo.

Beispiel 2

Bestimmung der Affinitätskonstanten sowie der Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation der produzierten Antikörper

25

Die Bestimmung der Affinitätskonstanten sowie der Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation der produzierten Antikörper erfolgte mit BIAcore[®] der Firma Pharmacia Biosensor (BIA steht für Biospezifische Interaktions Analysen). Das Messprinzip beruht auf der "Surface Plasmon Resonance". Die Messung wird auf einem Biosensor, dem sog. Sensorchip durchgeführt. An den mit Streptavidin beschichteten

30

Sensorchip wird das biotinylierte Peptid durch eine nichtkovalente, hochaffine Bindung gekoppelt. Über diesen Sensorchip wird eine Lösung des zu untersuchenden Antikörpers geleitet, wobei der Antikörper durch nichtkovalente Wechselwirkungskräfte an das immobilisierte Peptid gebunden wird.

5

Durch die Bindung der einzelnen Komponenten erhöht sich die Massendichte auf der Oberfläche des Sensorchips, die vom Gerät in ein proportionales Messignal umgewandelt wird. Aus der zeitlichen Änderung des Signals, dem Sensorgramm, lassen sich die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation und daraus die Affinitäts-

10 konstante berechnen.

15

Die Antikörper-Peptid-Komplexe lassen sich ohne Beeinträchtigung der an die Oberfläche gebundenen Peptide mit einfachen Mitteln wieder ablösen, so daß an demselben Sensorchip weitere Bindungsexperimente unter identischen Randbedingungen durchgeführt werden können.

20

Zur Kopplung der biotinylierten Peptide an den Sensorchip (SA, Pharmacia Biosensor) wird eine Lösung mit einer Konzentration von 50 nMol/l in HBS (10 mMol/l HEPES, 150 mMol/l NaCl 3,4 mMol/l EDTA 0,05 % P20 pH 7,4) über den Sensorchip mit einer Flußrate von 5 ml/min geleitet.

25

Danach werden die Antikörper in HBS zugegeben und die Bindung an die Peptide bei einer Flußrate von 10 µl/min verfolgt. Aus den Sensorgrammen werden die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und der Dissoziation der Bindung der Antikörper an die Peptide mit Hilfe einer Software des Herstellers (BIAevaluation 2.1, Pharmacia Biosensor) berechnet. Die Affinitätskonstante berechnet sich nach $K_a = k_{on}/k_{off}$. Die so ermittelten Werte der erfindungsgemäßen Antikörper an Bio-C-HA und BioN-HA als Antigene sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1

anti-HA-mAb	Antigen	kon l/mol*s	koff 1/s	Ka l/mol
Babco	Bio-C-HA	9.5 E +3	1.0 E -3	9.3 E +6
12CA5	Bio-C-HA	2.3 E +4	2.6 E -4	9.2 E +7
R3F10	Bio-C-HA	5.9 E +5	4.8 E -5	1.2 E +10
R3A12	Bio-C-HA	1.7 E +5	5.4 E -4	3.1 E +8
R6D12	Bio-C-HA	4.0 E +5	7.6 E -5	5.2 E +9
Babco	Bio-N-HA	1.2 E +4	5.0 E -4	2.3 E +7
12CA5	Bio-N-HA	5.3 E +4	2.1 E -4	2.6 E +8
R3F10	Bio-N-HA	6.2 E +5	9.1 E -5	6.8 E +9
R3A12	Bio-N-HA	7.7 E +5	1.4 E -4	5.7 E +9
R6D12	Bio-N-HA	5.9 E +5	1.2 E -4	5.1 E +9

Beispiel 3

Vergleichende Immunoblot-Analyse eines HA-modifizierten Proteins unter Verwendung eines erfindungsgemäßen Antikörpers und eines aus dem Stand der Technik bekannten

5 Antikörpers

3.1. Variation des Antigens

Mit dem HA-Epitop modifizierte Glutathion-S-transferase (GST-HA) wurde seriell auf
10 die angegebenen Mengen verdünnt, mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
separiert und nach Transfer auf eine Nylon-Membran mit Hilfe der angegebenen Anti-
körper in den angegebenen Konzentrationen der Primärantikörper umgesetzt (1 µg/ml
Klon 12CA5; 0.1 µg/ml Klon 3F10; Western-Blot-Analyse). Gebundene anti-HA-Anti-
körper wurden anschließend unter Verwendung von anti-Maus-Peroxidase (bei Klon
15 12CA5), anti-Ratte-Peroxidase (bei Klon 3F10, a)) bzw. anti-Ratte-Biotin/Streptavidin-
Peroxidase (bei Klon 3F10, b)) und Chemilumineszenz-Detektion nachgewiesen.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

20 Es wurden 8 x 7 cm große Gele mit 0.75 mm Dicke verwendet (BIO-RAD, Mini-Protean
II™). Für ein 15%-iges Gel wurden 6 ml Trenngellösung (1x) zwischen die Platten ge-
gossen. Die Trenngeloberkante wurde vorsichtig mit 1 ml Wasser überschichtet. Nach 30
min. Polymerisation wurde das Wasser entfernt und 2 ml Sammelgellösung (1x) einge-
füllt. Die Proben wurden mit 1 Volumen zweifach konzentriertem Laemmli-Puffer ver-
25 mischt, 10 min. bei 60°C inkubiert und in die gespülten Geltaschen pipettiert. Die
Elektrophorese erfolgte in Laufpuffer bei einer Stromstärke von ca. 15 mA.

Lösungen:**4 x Trenngellösung:**

5 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
 0,4 % SDS

4 x Sammelgellösung:

 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
10 0,4 % SDS

2 x Laemmli-Puffer:

 1,52 g Tris pro 100 ml
 10 ml Glyzerin pH 6,8 mit 1 N HCl eingestellt
15 2,0 g SDS
 2,0 ml 2-Mercaptoethanol
 1 mg Bromphenolblau

5 x Laufpuffer:

20 15,1 g Tris pro 1 l
 72,0 g Glycin
 5,0 g SDS

25 Transfer auf Nylon-Membran

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteinproben wurde ein der Gelgröße
entsprechender, mit H₂O befeuchteter Nylon-Filter auf das Gel aufgelegt. Zum besseren
Kontakt wurden beidseitig je zwei zugeschnittene Whatman[®]-3 MM-Papiere aufgelegt
30 und der Aufbau wurde in die Vorrichtung einer BIO-RAD Elektroblot-Apparatur einge-
spannt. Nach Füllen der Kammer mit Transfer-Puffer wurden die Proteine unter Eis-

kühlung und Rühren 45 - 60 min durch Anlegen einer Spannung von 70 V (Stromstärke, I=250-350 mA) auf die Membran transferiert.

Lösung:

5 **Transfer-Puffer:** 25 mM Tris/HCl, pH 8,3
 192 mM Glyzin

Detektion

10 Nach vorsichtigem Entfernen der Membran wurde der Filter zur Absättigung noch freier Bindungsstellen 60 min bei RT in PBS-Lösung unter Zusatz von 1% Blocking-Reagenz (PBS/PR; Boehringer Mannheim) inkubiert. Es wurde zweimal 10 min in PBS-Puffer unter Zusatz von 0.1% Tween-20 (PBST) gewaschen und 60 min mit dem entsprechenden anti-HA-Antikörper in den angegebenen Konzentrationen bei RT umgesetzt. Nach
15 dreimaligem Waschen in PBST-Puffer (je 5 min, RT) wurde der Filter weitere 60 min mit einem Anti-Spezies-IgG-Peroxidase-Konjugat (anti-Ratte-Peroxidase, 20 mU/ml PBS/BR; anti-Maus-Peroxidase, 40 mU/ml PBS/BR) bei RT inkubiert. Es wurde wiederum, wie oben beschrieben, gewaschen, und die Filtermembran nach Entfernung des Puffers mit einem saugfähigen Tuch in einer 1:100-Mischung von Detektionsreagenz
20 A+B (Boehringer Mannheim) 1 min inkubiert, anheftendes Reagenz entfernt. Mit dem mit Haushaltsfolie abgedeckten Filter wurde anschließend ein Röntgenfilm für 1 - 10 min exponiert.

Ergebnis

25

Mit einer um das 10-fache geringeren Antikörperkonzentration kann mit erfindungsgemäßen Antikörper, beispielsweise Klon 3F10 im Vergleich zu bekannten Antikörper wie Klon 12CA5 ein um den Faktor 30 geringere Menge an GST-HA detektiert werden (Abb. 2).

30

3.2 Variation der Konzentration des Primärantikörpers

Pro Spur wurden 4ng mit dem HA-Epitop modifizierte Glutathion-S-transferase (GST-HA) mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese separiert und nach Transfer auf eine
5 Nylon-Membran mit dem angegebenen Antikörper in den angegebenen Konzentrationen der Primärantikörper umgesetzt (Klon 12CA5 und 3F10; 2.0 - 0.008 ng/ml).
Gebundene anti-HA-Antikörper wurden anschließend unter Verwendung von anti-Maus-Peroxidase (bei Klon 12CA5) bzw. anti-Ratte-Peroxidase (bei Klon 3F10) und Chemilumineszenz-Detektion nachgewiesen.

10

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, Transfer auf eine Nylon-Membran und anschließende Detektion erfolgten wie in Beispiel 3.1 beschrieben.

Ergebnis:

15

Im beschriebenen Experiment wird Klon 12CA5 (Stand der Technik) bei einer Antikörperkonzentration von ≤ 2000 ng/ml zum limitierenden Faktor, während mit dem erfindungsgemäßen Klon 3F10 noch bei einer Antikörperkonzentration von ca. 125 ng/ml Signalsättigung beobachtet wird (Abb. 3).

20

Vergleichbare Signale werden im Falle von Klon 3F10 mit ca. 20-fach geringeren Antikörperkonzentrationen erreicht.

Beispiel 4

25

Vergleichende Analyse Immunoblot-Analyse eines HA-modifizierten Proteins mit Antikörper-Konjugate

30 Mit dem HA-Epitop modifizierte Glutathion-S-transferase (GST-HA) wurde seriell auf die angegebenen Mengen verdünnt, mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese separiert und nach Transfer auf eine Nylon-Membran mit Hilfe der angegebenen Anti-

körper-Peroxidase-Konjugaten in den angegebenen Konzentrationen umgesetzt (100 ng/ml (Klon 12CA5); 20 mU/ml (Klon 3F10)). Gebundene anti-HA-Antikörper wurden anschließend unter Verwendung von Chemilumineszenz-Detektion nachgewiesen.

- 5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, Transfer auf eine Nylon-Membran und anschließende Detektion erfolgte wie in Beispiel 3.1 beschrieben.

Ergebnis:

- 10 Die Detektionsgrenze in diesem System liegt für das Peroxidase-Konjugat des Klons 12CA5 (= Stand der Technik) bei ca. 1 ng GST-HA, während unter den gleichen Bedingungen mit dem entsprechenden Derivat des Klons 3F10 noch 40 pg GST-HA nachgewiesen werden können (Abb. 4).

15 Beispiel 5

Vergleichende Immunpräzipitation eines HA-modifizierten Proteins

- 20 Mit dem HA-Epitop modifiziertes Green-Fluorescent-Protein (GFP-HA) wurde mit den angegebenen Mengen [in µg] an anti-HA-Antikörper (Klon 12CA5 bzw. Klon 3F10) umgesetzt und nach Zugabe von Protein-G-Agarose immunpräzipitiert. Die erhaltenen Präzipitate wurden solubilisiert, mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese separiert und nach Transfer auf eine Nylon-Membran mit einem anti-HA-Peroxidase-konjugat (Klon 12CA5) und Chemilumineszenz-Detektion nachgewiesen.

25

Immunpräzipitation

- 30 50 ng mit dem HA-Epitop modifiziertes Green-Fluorescent-Protein (GFP-HA) wurden in 200 µl Waschpuffer verdünnt, mit den angegebenen Mengen an anti-HA-Antikörper versetzt und 1 h bei 4° C im Überkopfschüttler inkubiert. Dem Ansatz wurden daraufhin 25 µl einer 50%-igen Protein-G-Sepharose-Suspension zugefügt und es wurde erneut 1 h

wie zuvor inkubiert. Über Protein-G an die Gelmatrix gebundene Proteine wurden dreimal mit je 1 ml Waschpuffer gewaschen, wobei bei jedem Waschschrift der Ansatz 2 min wie oben beschrieben bei 4° C inkubiert wurde. Der Ansatz wurde dann 2 min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (15 000 Upm, RT) und das Pellet in 10 ml
5 1xLaemmli-Auftragspuffer aufgenommen. Die immunpräzipitierten Proteine wurden anschließend durch denaturierende Gelelektrophorese (SDS-Polyacrylamidgel) separiert.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, Transfer auf eine Nylon-Membran und anschließende Detektion erfolgte wie in Beispiel 3.1 beschrieben.

10

Ergebnis:

Im beschriebenen Experiment ist der Klon 3F10 im Vergleich zum Klon 12CA5 (Stand der Technik) in der Lage, bei Verwendung einer um den Faktor ≥ 20 geringeren Antikörpermenge das eingesetzte Antigen zu präzipitieren (Abb. 5).
15

INTERNATIONALES FORMBLATT

Boehringer Mannheim GmbH
Sandhofer Str. 116

68305 Mannheim

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: R3A12	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM ACC2286
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
<p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p>() eine wissenschaftliche Beschreibung</p> <p>() eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).</p>	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 1996-10-08 (Datum der Ersthinterlegung) ¹ eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
<p>Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</p>	<p>Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:</p> <p><i>V. Weber</i></p> <p>Datum: 1996-10-18</p>

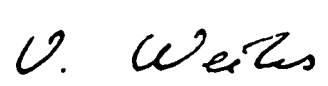
¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

INTERNATIONAL FORM

Boehringer Mannheim GmbH
Sandhofer Str. 116

68305 Mannheim

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: R3A12	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2286
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
<p>The microorganism identified under I. above was accompanied by:</p> <p>() a scientific description () a proposed taxonomic designation</p> <p>(Mark with a cross where applicable).</p>	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
<p>This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 1996-10-08 (Date of the original deposit)¹.</p>	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
<p>The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).</p>	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 1996-10-18

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

INTERNATIONALES FORMBLATT

Boehringer Mannheim GmbH
 Sandhofer Str. 116
 68305 Mannheim

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
 ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
 INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
Name: Boehringer Mannheim GmbH Sandhofer Str. 116 Anschrift: 68305 Mannheim	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM ACC2286 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung: 1996-10-08
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG	
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 1996-10-09 ¹ geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus (X) ¹ lebensfähig () ¹ nicht mehr lebensfähig	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFAHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST ²	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten: <i>V. Wetts</i> Datum: 1996-10-18

- ¹ Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.
² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
³ Zutreffendes ankreuzen.
⁴ Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

INTERNATIONAL FORM

Boehringer Mannheim GmbH
Sandhofer Str. 116

68305 Mannheim

VIABILITY STATEMENT

issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
<p>Name: Boehringer Mannheim GmbH Sandhofer Str. 116</p> <p>Address: 68305 Mannheim</p>	<p>Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM ACC2286</p> <p>Date of the deposit or the transfer: 1996-10-08</p>
III. VIABILITY STATEMENT	
<p>The viability of the microorganism identified under II above was tested on 1996-10-09¹. On that date, the said microorganism was</p> <p>(X)² viable</p> <p>()³ no longer viable</p>	
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED ⁴	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
<p>Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</p>	<p>Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):</p> <p><i>V. W. L. W.</i></p> <p>Date: 1996-10-18</p>

¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).

² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.

³ Mark with a cross the applicable box.

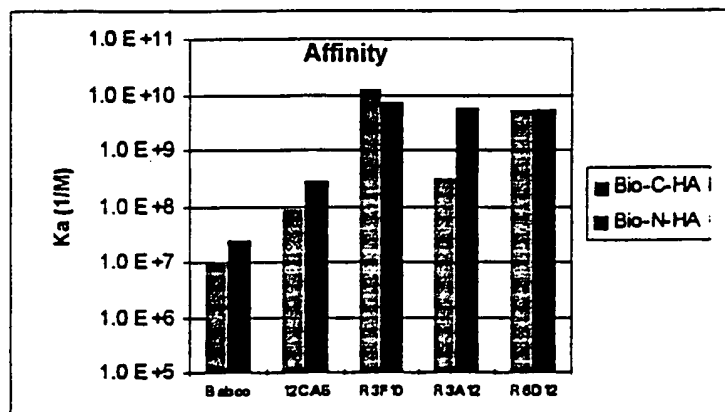
⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

Patentansprüche

1. Monoklonale Antikörper gegen das Epitop YPYDVPDYA, das aus dem Hämagglutinin des humanen Influenzavirus abgeleitet ist, bzw. Fragmente hiervon,
5 dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Affinität $> 10^8 \text{ M}^{-1}$ besitzen.
2. Monoklonale Antikörper nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Affinität von $10^9 - 10^{10} \text{ M}^{-1}$ besitzen.
- 10 3. Monoklonale Antikörper nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie von Hybridomen produziert werden, die man durch Fusion der Myelomzellen Maus P3x63-Ag8.653 mit B-Lymphozyten aus Lou/C-Ratten erhält, wobei die Lou/C-Ratten mit einem HA-Peptid immunisiert wurden.
- 15 4. Monoklonale Antikörper nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Immunisierung mit einem an Keyhole Limpet Hämocyanin (KLH) gekoppelten HA-Peptid erfolgt.
5. Monoklonale Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie vom Hybridom R 3A12, hinterlegt in der Deutschen Sammlung
20 für Mikroorganismen und Zellkulturen unter der Nr. DSM ACC2286 (08.10.1996), produziert werden.
6. Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man ein HA-Peptid synthetisiert und
25 damit Kleinsäuger immunisiert, die B-Lymphozyten aus der Milz der Tiere gewinnt und mit Myelomzellen Maus P3x62-Ag8.653 fusioniert, die entstandenen Klone, die an ein HA-Peptid und an ein HA-Fusionsprotein binden, selektioniert und von diesen die Klone mit hoher Affinität auswählt und als Hybridzelllinien etabliert.

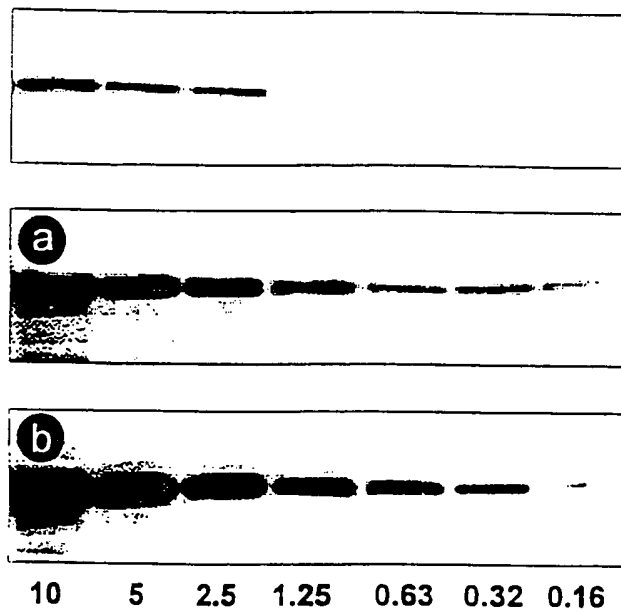
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß man als HA-Peptid Acetyl-YPYDVPDYAGSGSK(ϵ -Biotinoyl)-Amid oder Biotinoyl- ϵ -Aca-SGSGYPYDVPDYA-Amid einsetzt.
- 5 8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß man als HA-Fusionsprotein HA-getaggte Glutathion-S-Transferase einsetzt.
9. Verwendung von monoklonalen Antikörpern nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß sie zum Nachweis und zur Isolierung von nativem
10 Hämagglutinin des humanen Influenzavirus, von modifiziertem Hämagglutinin oder von HA-Fusionsproteinen eingesetzt werden.

Abbildung 1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

Abbildung 2

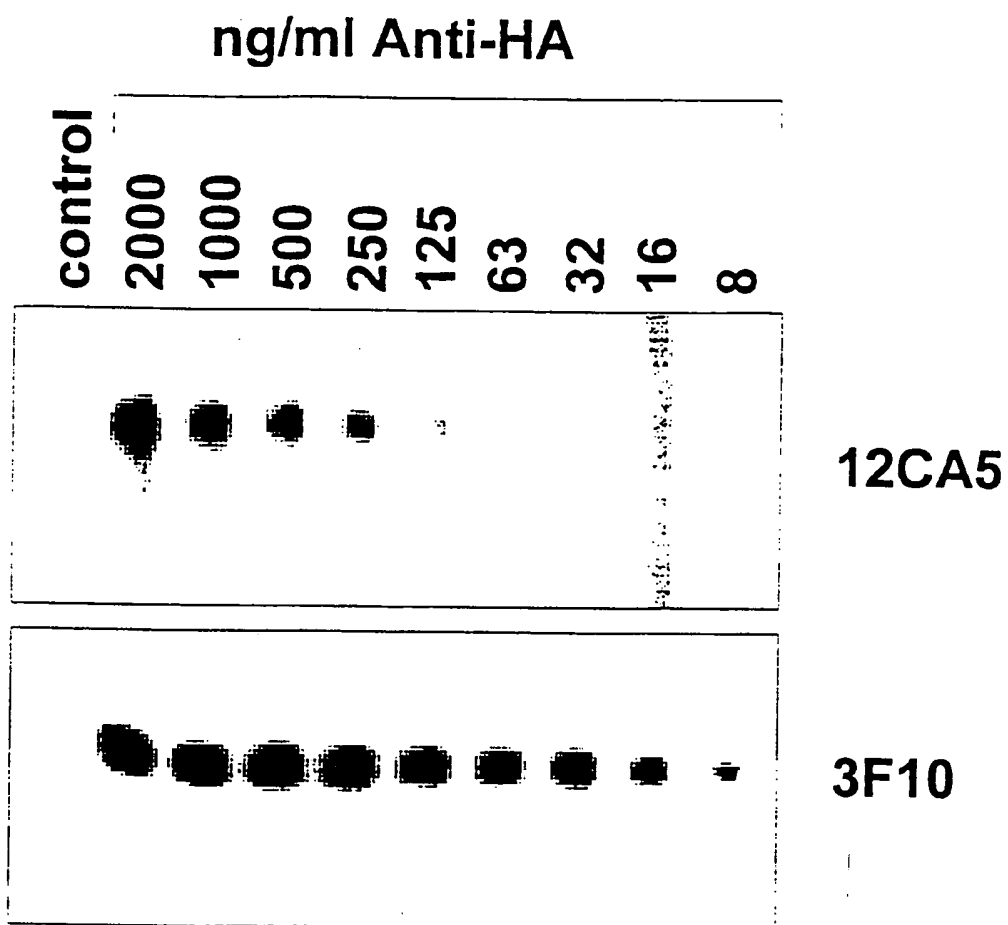


ng GST-HA

12CA5 [1.0 $\mu\text{g/ml}$]3F10 [0.1 $\mu\text{g/ml}$]

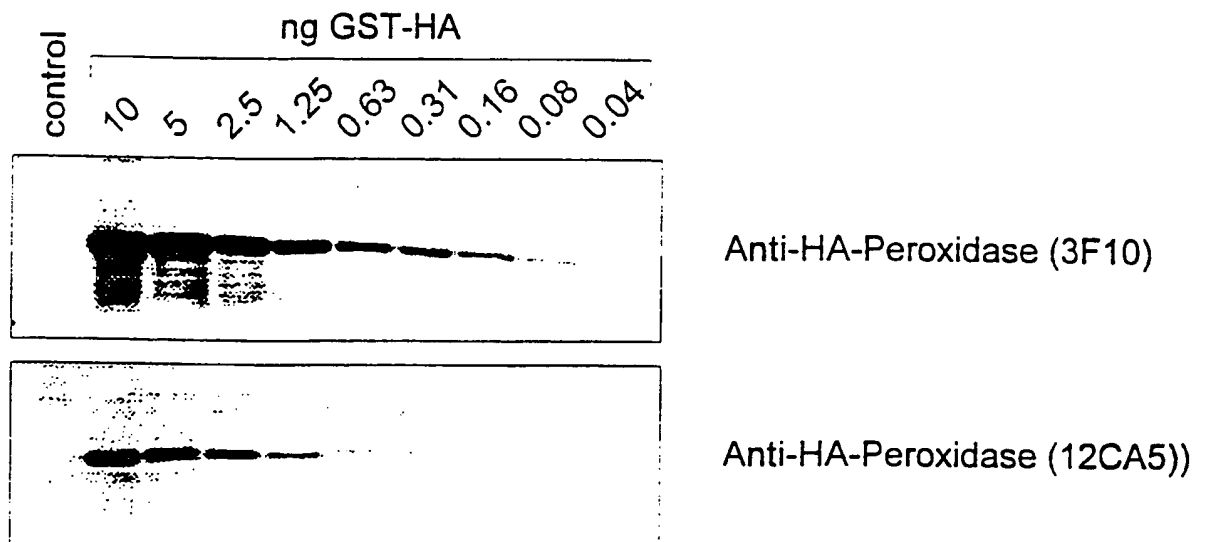
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Abbildung 3

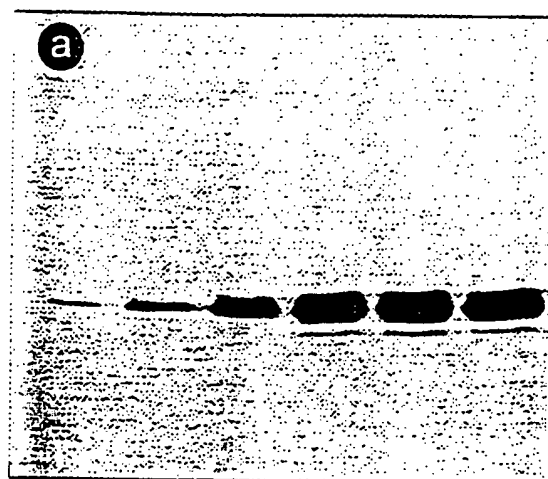


THIS PAGE BLANK (USPTO)

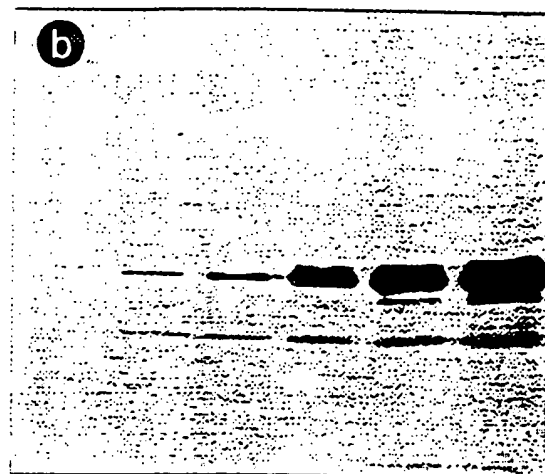
Abbildung 4



THIS PAGE BLANK (USPTO)



μg 3F10



μg 12CA5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/05783

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K16/10 C12P21/08 G01N33/577

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	M. HINDS ET AL.: "Synthesis, conformational properties, and antibody recognition of peptides containing beta-turn mimetics based on alpha-alkylproline derivatives." JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 34, no. 6, June 1991, WASHINGTON, DC, USA, pages 1777-1789, XP002057282 see page 1783, right-hand column, line 29 - page 1784, right-hand column, line 61 see table IV --- -/--	1,6,9



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents; such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 February 1998

Date of mailing of the international search report

19.03.98

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Nooij, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 97/05783

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>P. KOLODZIEJ ET AL.: "Epitope tagging and protein surveillance." METHODS IN ENZYMOLOGY, vol. 194, 1991, NEW YORK, NY, USA, pages 508-519, XP002057283 cited in the application see page 510, line 25 - page 511, line 6 ---</p>	1-9
A	<p>J. FIELD ET AL.: "Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> by use of an epitope addition method." MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 8, no. 5, May 1988, WASHINGTON, DC, USA, pages 2159-2165, XP002057284 cited in the application see page 2160, left-hand column, line 31 - line 44 ---</p>	1-9
A	<p>Y. CHEN ET AL.: "Expression and localization of two low molecular weight GTP-binding proteins, Rab8 and Rab10, by epitope tag." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, vol. 90, no. 14, 15 July 1993, WASHINGTON, DC, USA, pages 6508-6512, XP002057285 cited in the application see abstract see figure 1 ---</p>	1-9
A	<p>WO 92 09300 A (ITEREC PHARMACEUTICALS LTD, PARTNERSHIP) 11 June 1992 see example 8 -----</p>	1-9

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern: des Aktenzeichens

PCT/EP 97/05783

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9209300 A	11-06-92	AU 668347 B	02-05-96
		CA 2090860 A	22-05-92
		EP 0558671 A	08-09-93
		JP 6507378 T	25-08-94
		US 5504190 A	02-04-96
		US 5556762 A	17-09-96

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 97/05783

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see supplémental sheet ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 97/05783

Note : Although claim 9 (in as much it is related with an in vivo method) refers to a diagnostic method to be applied to human/animal bodies, the search was made based on the indicated effects of the compound.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/05783

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9209300 A	11-06-92	AU 668347 B	02-05-96
		CA 2090860 A	22-05-92
		EP 0558671 A	08-09-93
		JP 6507378 T	25-08-94
		US 5504190 A	02-04-96
		US 5556762 A	17-09-96

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. ationales Aktenzeichen
PCT/EP 97/05783

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Bemerkung : Obwohl der Anspruch 9 (teilweise, in so weit es sich handelt um ein in vivo Verfahren) sich auf ein Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird, bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.